

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2022.05.004

• 实验研究 •

热毒宁注射液联合西药对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌体外抑菌作用实验研究*

肖衍豪¹ 廖彬^{1△} 陆巧燕² 谭颖华² 贤永嫦¹
贺勤² 谢友凤¹ 杜顺霞² 蒙铖¹ 张宇³

南宁市第八人民医院¹检验科,²药剂科,³输血科,南宁 530001

摘要 目的 研究热毒宁注射液与头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦联用对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌(carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa, CRPA)的体外抑菌作用。**方法** 于临床标本中分离、收集 40 株 CRPA,采用梯度稀释法测定热毒宁注射液最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),采用倍比稀释法分别测定头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦 MIC;采用微量棋盘稀释法检测联合用药 MIC,并计算热毒宁注射液联合头孢他啶、热毒宁注射液联合头孢哌酮/舒巴坦的部分抑菌浓度(fraction inhibitory concentration, FIC)指数。**结果** 单药抑菌实验中,77.5%的 CRPA 热毒宁 MIC 为 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$,77.5%的 CRPA 头孢他啶 MIC 位于 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,87.5%的 CRPA 头孢哌酮/舒巴坦 MIC 位于 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。热毒宁与头孢他啶联合抑菌实验中,75.0%的 CRPA 热毒宁 MIC 位于 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ~350 $\mu\text{L}/\text{mL}$,65.0%的 CRPA 头孢他啶 MIC 位于 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,FIC 指数:FIC ≤ 0.5 为 2.5%, $0.5 < \text{FIC} \leq 1.0$ 为 67.5%, $1.0 < \text{FIC} \leq 2.0$ 为 30.0%,FIC > 2.0 为 0%。热毒宁与头孢哌酮/舒巴坦联合抑菌实验中,70.0%的 CRPA 热毒宁 MIC 位于 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ~350 $\mu\text{L}/\text{mL}$,85.0%的 CRPA 头孢哌酮/舒巴坦 MIC 位于 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$,FIC 指数:FIC ≤ 0.5 为 10.0%, $0.5 < \text{FIC} \leq 1.0$ 为 70.0%, $1.0 < \text{FIC} \leq 2.0$ 为 20.0%,FIC > 2.0 为 0%。**结论** 热毒宁注射液分别与头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦联用均以相加和无关作用为主,联用后可降低各药的抑菌浓度,体外联合抑菌作用表现良好。

关键词 热毒宁注射液;头孢他啶;头孢哌酮/舒巴坦;耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌;抑菌作用

中图分类号 R285.5;R969.3 **文献标志码** A

Experimental Study on Bacteriostatic Effect of Reduning Injection Combined with Western Medicine on Carbapenem-resistant Pseudomonas Aeruginosa in Vitro

XIAO Yanhao¹, LIAO Bin¹, LU Qiaoyan², TAN Yinghua², XIAN Yongchang¹,

HE Qin², XIE Youfeng¹, DU Shunxia², MENG Cheng¹, ZHANG Yu³

¹Department of Laboratory, ²Department of Pharmacy, ³Department of Blood Transfusion, the Eighth People's Hospital of Nanning, Nanning 530001, China

Abstract Objective To study the bacteriostatic effect of Reduning injection combined with ceftazidime and cefoperazone/sulbactam on carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa(CRPA)in vitro. **Methods** Forty strains of CRPA were isolated and collected from clinical specimens. The minimal inhibitory concentration(MIC)of Reduning injection was determined by the gradient dilution method. The MIC of ceftazidime and cefoperazone/sulbactam was determined by the double ratio dilution method. The MIC of the combination drugs were determined by the mi-

* 广西壮族自治区中医药管理局自筹经费科研课题(No. GXZY20210028)

△通信作者, Corresponding author, E-mail: 445896917@qq.com

crodilution checkerboard method, and the fraction inhibitory concentration (FIC) index of Reduning injection combined with ceftazidime and Reduning injection combined with cefoperazone/sulbactam were calculated. **Results** In the single-agent bacteriostasis experiment, 77.5% of the CRPA showed that the MIC of Reduning was 500 $\mu\text{L/mL}$. 77.5% of the CRPA showed that the MIC of ceftazidime were located at 32 $\mu\text{g/mL}$ ~64 $\mu\text{g/mL}$. 87.5% of the CRPA showed that the MIC of cefoperazone/sulbactam were located at 64 $\mu\text{g/mL}$ ~128 $\mu\text{g/mL}$. In the bacteriostasis experiment of Reduning combined with ceftazidime, 75.0% of the CRPA showed that the MIC of Reduning were located at 250 $\mu\text{L/mL}$ ~350 $\mu\text{L/mL}$. 65.0% of the CRPA showed that the MIC of ceftazidime were located at 8 $\mu\text{g/mL}$ ~16 $\mu\text{g/mL}$. The FIC index of Reduning combined with ceftazidime showed: $\text{FIC} \leq 0.5$ was 2.5%, $0.5 < \text{FIC} \leq 1.0$ was 67.5%, $1.0 < \text{FIC} \leq 2.0$ was 30.0%, $\text{FIC} > 2.0$ was 0%. In the bacteriostasis experiment of Reduning combined with cefoperazone/sulbactam, 70.0% of the CRPA showed that the MIC of Reduning were located at 250 $\mu\text{L/mL}$ ~350 $\mu\text{L/mL}$. 85.0% of the CRPA showed that the MIC of cefoperazone/sulbactam were located at 8 $\mu\text{g/mL}$ ~32 $\mu\text{g/mL}$. The FIC index of Reduning combined with cefoperazone/sulbactam showed: $\text{FIC} \leq 0.5$ was 10.0%, $0.5 < \text{FIC} \leq 1.0$ was 70.0%, $1.0 < \text{FIC} \leq 2.0$ was 20.0%, $\text{FIC} > 2.0$ was 0%. **Conclusion** Reduning injection combined with ceftazidime and cefoperazone/sulbactam had additive and unrelated effects, which could reduce the bacteriostatic concentration of each drug, and had the good bacteriostatic effect in vitro.

Key words Reduning injection; ceftazidime; cefoperazone/sulbactam; carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa; bacteriostatic effect

铜绿假单胞菌是院内感染的主要致病菌, 主要发生在 ICU、呼吸科及烧伤科^[1]。由于抗菌药物滥用、误用等不正规使用情况日趋严重, 导致耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌 (carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa, CRPA) 所致感染日趋增多^[2]。因此, 中西药联合治疗细菌感染逐渐受到关注。热毒宁注射液由青蒿、金银花和栀子 3 味中药组成, 具有清热、疏风、解毒作用, 临床上常用于上呼吸道感染、急性支气管炎的治疗; 其临床疗效确切, 具有较高的安全性^[3-4]。为了解决临床对 CRPA 治疗药物选择的难题, 本实验探讨热毒宁注射液分别与头孢他啶 (ceftazidime, CAZ)、头孢哌酮/舒巴坦 (cefoperazone/sulbactam, SCF) 联合用药的体外抑菌作用, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

收集南宁市第八人民医院检验科微生物室 2020 年 1 月—2021 年 12 月的临床标本, 从中分离非重复株 CRPA 40 株。40 个样本来源情况: 男 27 人, 女 13 人; 年龄 30~95 岁, 平均 (75 $\pm$ 14) 岁; 60 岁以上 34 人, 占 85%。标准菌株铜绿假单胞菌 ATCC27853 购自国家卫生健康委临床检验中心。

1.2 培养基和抗菌药物

血液增菌培养基 (杭州滨和, 批号: 210907), 水解络蛋白琼脂 (杭州滨和, 批号: 210816), 血琼脂培养基 (郑州安图), 麦康凯琼脂培养基 (郑州安图), 生化药敏鉴定板 (法国梅里埃公司)。注射用头孢他啶 (东北

制药集团沈阳第一制药有限公司, 1.0 g/瓶, 批号: 201260); 注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠 (头孢哌酮: 舒巴坦 = 1 : 1, 辉瑞制药有限公司, 1.0 g/瓶, 批号: 20201223); 热毒宁注射液 (江苏康缘药业股份有限公司, 批号: 210302)。

1.3 主要实验仪器

生物安全柜 (海尔)、ABT 半自动生化药敏鉴定仪 (法国生物梅里埃公司)、显微镜 (奥林巴斯)、电热恒温培养箱 (上海跃进)、手提式不锈钢蒸汽消毒锅 (型号: YX20B) 等。

1.4 实验方法

1.4.1 细菌的检验 将临床收集到的菌株进行重新分离鉴定, 按照《全国临床检验操作规程》第三版标准进行分纯培养、鉴定和药敏实验。

1.4.2 实验菌液配制 取经过分纯培养的菌落 1~2 个, 用 5 mL 生理盐水配制成 0.5 麦氏浊度菌悬液, 再用 MH 肉汤稀释 10 倍备用, 稀释的菌液应在 15 min 内接种完毕。

1.4.3 确定单药最低抑菌浓度 对热毒宁注射液进行浓度递减实验, 确定热毒宁的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC): 取 12 支试管按 1~12 顺序进行编号, 依次在 1~12 号试管中加入不同浓度的热毒宁溶液, 用微量移液器向每支试管中加入实验菌液, 保证最终试管内的接种浓度为 5×10^5 CFU/mL。置于 35℃ 电热恒温培养箱中培养 24 h。

分别对头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦进行倍比稀释实验, 确定头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦的 MIC: 分

别取 2 组各 12 支试管按顺序编号,在 2~12 号试管中加入 1 mL 的 MH 肉汤,分别在 1 号和 2 号试管中加入头孢他啶(或头孢哌酮/舒巴坦)1 mL(浓度为 4096 g/mL),从 2 号试管开始对倍稀释直至 12 号试管,用微量移液器向 1~12 号试管中分别加入实验菌液,保证最终试管内的接种浓度 5×10^5 CFU/mL。置于 35℃ 电热恒温培养箱中培养 24 h。

1.4.4 确定联合用药稀释度 采用微量棋盘稀释法分别配制不同浓度的热毒宁+头孢他啶、热毒宁+头孢哌酮/舒巴坦肉汤。依据 96 孔板自带的孔位编号,在横排中,将头孢他啶(或头孢哌酮/舒巴坦)按 12→1 方向进行倍比稀释;在纵列中,将热毒宁按 A→H 方向进行梯度稀释,同时保证第 H 排只有头孢他啶(或头孢哌酮/舒巴坦)1 种药,第 1 列只有热毒宁 1 种药物。最后加入实验菌液,保证最终接种浓度为 5×10^5 CFU/mL,置于 35℃ 电热恒温培养箱中培养 24 h。

40 株 CRPA 均与标准菌株 ATCC27853 平行操作。

1.5 结果判读

经培养后观察各孔位的浑浊情况,澄清表明细菌生长受抑制,浑浊表明细菌生长。以无细菌生长的最低药物浓度为 MIC。

1.6 联合用药的部分抑菌浓度指数计算

部分抑菌浓度(fraction inhibitory concentration, FIC)指数=A 药联合的 MIC/A 药单用的 MIC+B 药联合的 MIC/B 药单用的 MIC。相互作用解释:FIC 指数 ≤ 0.5 为协同作用; $0.5 < \text{FIC 指数} \leq 1.0$ 为相加作用; $1.0 < \text{FIC 指数} \leq 2.0$ 为无关作用;FIC 指数 > 2.0 为拮抗作用。

2 结果

2.1 3 种药物单用对标准菌株 ATCC27853 及 40 株 CRPA 的 MIC 值

根据上述热毒宁浓度递减实验结果,最终确定热毒宁对 ATCC27853 的 MIC 为 400 $\mu\text{L/mL}$;根据上述头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦浓度倍比稀释抑菌实验结果,头孢他啶对 ATCC27853 的 MIC 为 16 $\mu\text{g/mL}$,头孢哌酮/舒巴坦对 ATCC27853 的 MIC 为 32 $\mu\text{g/mL}$ 。

40 株 CRPA 中,热毒宁 MIC 集中于 500 $\mu\text{L/mL}$, 共有 31 株(77.5%);头孢他啶 MIC 集中于 32 $\mu\text{g/mL}$ ~64 $\mu\text{g/mL}$, 共有 31 株(77.5%);头孢哌酮/舒巴坦 MIC 集中于 64 $\mu\text{g/mL}$ ~128 $\mu\text{g/mL}$, 共有 35 株(87.5%)。见表 1。

表 1 热毒宁、头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦单独用药的 MIC

编号	热毒宁 MIC ($\mu\text{L/mL}$)	CAZ MIC ($\mu\text{g/mL}$)	SCF MIC ($\mu\text{g/mL}$)	编号	热毒宁 MIC ($\mu\text{L/mL}$)	CAZ MIC ($\mu\text{g/mL}$)	SCF MIC ($\mu\text{g/mL}$)
1	500	64	64	21	500	32	64
2	500	32	64	22	500	128	64
3	600	128	64	23	500	128	64
4	500	64	32	24	500	32	64
5	500	64	128	25	500	64	64
6	500	64	64	26	500	64	64
7	500	64	64	27	500	64	32
8	500	64	32	28	500	32	128
9	500	32	128	29	600	32	128
10	600	32	128	30	600	32	128
11	600	32	128	31	500	32	128
12	500	32	128	32	500	32	64
13	500	32	64	33	500	32	64
14	500	32	64	34	500	64	128
15	500	64	128	35	500	64	128
16	500	64	128	36	600	64	256
17	600	64	256	37	700	128	128
18	700	128	128	38	500	128	128
19	500	128	128	39	500	128	128
20	500	128	128	40	500	32	64

2.2 热毒宁与头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦联合用药结果

热毒宁与头孢他啶联用:ATCC27853 的热毒宁 MIC 为 200 $\mu\text{L/mL}$,头孢他啶 MIC 为 4 $\mu\text{g/mL}$;40 株 CRPA 中,有 30 株(75.0%)CRPA 的热毒宁 MIC 位于 250 $\mu\text{L/mL}$ ~350 $\mu\text{L/mL}$,有 26 株(65.0%)CRPA 的头孢他啶 MIC 位于 8 $\mu\text{g/mL}$ ~16 $\mu\text{g/mL}$ 。

热毒宁与头孢哌酮/舒巴坦联用:ATCC27853 的热毒宁 MIC 为 150 $\mu\text{L/mL}$,头孢哌酮/舒巴坦 MIC 为 8 $\mu\text{g/mL}$;40 株 CRPA 中,有 28 株(70.0%)CRPA 的

热毒宁 MIC 位于 250 $\mu\text{L/mL}$ ~350 $\mu\text{L/mL}$,有 34 株(85.0%)CRPA 的头孢哌酮/舒巴坦 MIC 位于 8 $\mu\text{g/mL}$ ~32 $\mu\text{g/mL}$ 。

热毒宁与头孢他啶联用 FIC 指数:FIC $\leq$ 0.5 为 2.5%(1/40),0.5<FIC $\leq$ 1.0 为 67.5%(27/40),1.0<FIC $\leq$ 2.0 为 30.0%(12/40),FIC>2.0 为 0%(0/40);热毒宁与头孢哌酮/舒巴坦联用 FIC 指数:FIC $\leq$ 0.5 为 10.0%(4/40),0.5<FIC $\leq$ 1.0 为 70.0%(28/40),1.0<FIC $\leq$ 2.0 为 20.0%(8/40),FIC>2.0 为 0%(0/40)。见表 2、表 3。

表 2 热毒宁与头孢他啶联合用药的 MIC 和 FIC 指数

编号	热毒宁 MIC ($\mu\text{L/mL}$)	CAZ MIC ($\mu\text{g/mL}$)	FIC 指数	编号	热毒宁 MIC ($\mu\text{L/mL}$)	CAZ MIC ($\mu\text{g/mL}$)	FIC 指数
1	350	32	1.20	21	300	16	1.10
2	300	16	1.10	22	400	64	1.30
3	350	16	0.71	23	350	32	0.95
4	300	32	1.10	24	300	16	1.10
5	350	16	0.95	25	300	16	0.85
6	300	16	0.85	26	300	16	0.85
7	250	16	0.75	27	200	8	0.53
8	300	16	0.85	28	250	8	0.75
9	200	8	0.65	29	250	8	0.67
10	250	8	0.67	30	250	4	0.54
11	300	8	0.75	31	250	8	0.75
12	150	4	0.43	32	300	8	0.85
13	300	8	0.85	33	250	8	0.75
14	200	8	0.65	34	350	32	1.20
15	400	16	1.05	35	300	16	0.85
16	300	16	0.85	36	250	32	0.92
17	350	16	0.83	37	500	32	0.96
18	600	64	1.36	38	400	32	1.05
19	300	32	0.85	39	400	64	1.30
20	350	32	0.95	40	350	16	1.20

表 3 热毒宁与头孢哌酮/舒巴坦联合用药的 MIC 和 FIC 指数

编号	热毒宁 MIC ($\mu\text{L/mL}$)	SCF MIC ($\mu\text{g/mL}$)	FIC 指数	编号	热毒宁 MIC ($\mu\text{L/mL}$)	SCF MIC ($\mu\text{g/mL}$)	FIC 指数
1	400	32	1.30	21	300	16	0.85
2	300	16	0.85	22	400	64	1.80
3	350	8	0.71	23	350	32	1.20
4	300	32	1.60	24	300	16	0.85
5	350	16	0.83	25	300	16	0.85
6	300	16	0.85	26	300	16	0.85
7	250	16	0.75	27	200	8	0.65
8	300	4	0.73	28	250	8	0.56
9	400	32	1.05	29	250	8	0.48
10	250	16	0.54	30	250	4	0.45
11	300	32	0.75	31	250	8	0.56
12	200	16	0.53	32	300	8	0.73
13	200	4	0.46	33	250	8	0.63
14	200	8	0.53	34	350	32	0.95
15	200	8	0.46	35	300	16	0.73
16	300	16	0.73	36	250	32	0.54
17	350	16	0.65	37	500	32	0.96
18	500	64	1.21	38	400	32	1.05
19	300	32	0.85	39	400	64	1.30
20	350	32	0.95	40	350	16	0.95

3 讨论

碳青霉烯类抗生素被认为是治疗铜绿假单胞菌感染的强效药物,但在过去的几年里,世界各地均监测到碳青霉烯类抗生素耐药率的上升^[6]。中药具有应用方便、经济安全的优势,且许多中药具有抗菌活性,同时不良反应小、不易产生耐药性,故从天然药物中寻找高效、低毒的抗菌药物,对解决细菌耐药性具有重要意义^[6-7]。

热毒宁注射液以青蒿为君药,能清热凉血、透散肌表;金银花为臣药,擅清热解毒、透散表邪,协助增强青蒿清热透散之力;栀子为佐药,具有解毒、清热、凉血、清泄心肺胃的功效^[8]。研究^[9]表明,热毒宁注射液具有较好的解热抗炎功效。本实验中,热毒宁注射液联合头孢他啶时,共有 30 株(75.0%)CRPA 的热毒宁 MIC 降至 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ~350 $\mu\text{L}/\text{mL}$,联合用药后头孢他啶 MIC 均较单独用药时下降 50%及以上,与刘佳^[10]的研究结果相似。当热毒宁联合头孢哌酮/舒巴坦时,有 28 株(70.0%)CRPA 的热毒宁 MIC 降至 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ~350 $\mu\text{L}/\text{mL}$,联合用药后共有 34 株(85.0%)CRPA 的头孢哌酮/舒巴坦 MIC 较单独用药时下降 50%及以上,与林昱等^[11]研究报道结果相似。此外,热毒宁注射液与头孢他啶联用以相加(67.5%)和无关(30.0%)作用为主;热毒宁注射液和头孢哌酮/舒巴坦联用以相加(70.0%)和无关(20.0%)作用为主;热毒宁注射液与上述 2 种抗生素联用均未发现拮抗作用,联合用药抑菌作用均表现良好。

综上所述,热毒宁与头孢他啶和头孢哌酮/舒巴坦联合应用后,其抑菌所需浓度明显低于单独用药浓度;这可能得益于中药多靶点、多途径的作用特点,但具体抑菌机制需进一步研究。此外,本次实验所用药品均为注射制剂,其在体内的抑菌效果如何仍有待进一步研究验证。

参 考 文 献

[1] Shariati A, Azimi T, Ardebili A, et al. Insertional inactivation of oprD in carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients in Tehran, Iran [J]. *New Microbes New Infect*, 2017, 21: 75-80.

[2] 李爱芳. 耐碳青霉烯类药物铜绿假单胞菌临床分布及耐药特点[J]. *中国抗生素杂志*, 2021, 46(7): 706-710.

[3] 吴鹏, 江勇, 郑文江, 等. 基于网络药理学探讨热毒宁注射液治疗登革热的分子机制[J]. *广州中医药大学学报*, 2022, 39(1): 143-151.

[4] 郑宏, 张海, 朱志国, 等. 热毒宁注射液治疗急诊相关疾病的研究进展[J]. *临床合理用药杂志*, 2020, 13(9): 179-181.

[5] Perez LRR, Carniel E, Narvaez GA. Emergence of NDM-producing *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients and impact on antimicrobial therapy during the coronavirus disease 2019(COVID-19) pandemic[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2021: 1-3.

[6] 李娟, 张学顺, 傅春升. 中药抗菌作用的研究进展[J]. *中国药业*, 2014, 23(2): 90-93.

[7] 张民. 细菌耐药背景下的中药抗菌作用探析[J]. *西部中医药*, 2013, 26(6): 122-124.

[8] 葛雯, 李海波, 于洋, 等. 热毒宁注射液化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(5): 1027-1036.

[9] 戴莎莎, 夏晨. 热毒宁联合五维赖氨酸颗粒治疗手足口病的疗效及对血清 cTnI 和 CK-MB 水平影响[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(4): 176-179.

[10] 刘佳. 三种中药注射液联合药物对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌抑菌试验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.

[11] 林昱, 汪华, 李鹏. 热毒宁联合头孢哌酮/舒巴坦钠和替加环素对泛耐药鲍氏不动杆菌肺炎的抑菌效果[J]. *中华医院感染学杂志*, 2022, 32(3): 331-335.

(收稿日期: 2022-04-28)